

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-83163

(P2001-83163A)

(43)公開日 平成13年3月30日(2001.3.30)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターム(参考)

G 0 1 N 35/02

G 0 1 N 35/02

F 2 G 0 4 5

C 1 2 N 15/00

C 1 2 Q 1/68

Z 2 G 0 5 8

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 1/10

N 4 B 0 6 3

G 0 1 N 1/10

33/50

33/50

33/53

M

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平11-262923

(22)出願日

平成11年9月17日(1999.9.17)

(71)出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 小川 雅司

東京都港区西麻布2丁目26番30号 富士写

真フイルム株式会社内

(74)代理人 100073184

弁理士 柳田 征史 (外1名)

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB03 HA14

2G058 AA09 CC02 CC11

4B063 QA01 QA08 QA12 QA13 QA17

QA18 QQ41 QQ42 QQ52 QQ79

QQ96 QR56 QR84 QS34 QS39

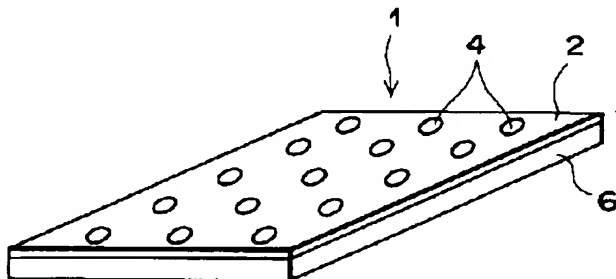
QX02 QX07

(54)【発明の名称】 高密度マクロアレイ

(57)【要約】

【課題】従来のものよりも高密度にスポットを配置したマクロアレイを提供する。

【解決手段】相互に独立した貫通孔3を備えた多孔質のメンブレン2に生体高分子等の被検物質を含むスポット4を多数高密度に配置することによって、本発明の高密度マクロアレイ1が製造される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 相互に独立した貫通孔を備えた多孔質メンブレンに被検物質を含むスポットを多数配置して成ることを特徴とするマクロアレイ。

【請求項2】 前記多孔質メンブレンの貫通孔の平均孔径が $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1に記載のマクロアレイ。

【請求項3】 前記多孔質メンブレンの膜厚が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1または2に記載のマクロアレイ。

【請求項4】 前記多孔質メンブレンを支持するための支持材が備えられていることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のマクロアレイ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子発現解析等の分子生物学研究や医療分野その他の分野において利用され得るマクロアレイに関する。

## 【0002】

【従来の技術】メンブレン上にDNA等の生体高分子を含むスポット（ドット）が多数配置（形成）されて成るマクロアレイは、1枚のメンブレン上において多数・多種類の試料を一度に解析することが可能であることから、分子生物学・医療分野で多用されている。

【0003】例えば、ニトロセルロース、ナイロン等のメンブレン（ $10\text{cm}\times 10\text{cm}$ 程度）上に各々が異なる遺伝子を含む多種類のDNA試料に基づく多数のスポットを整然と配置して成るマクロアレイを作製する。而して、当該アレイ上に全mRNA等をもとにして調製したプローブを加えてハイブリダイゼーション等を行うことによって、多数の遺伝子の挙動を一度に解析することができる。

【0004】ところで、図4および図5に示すように、スポンジ状に曲がりくねった網目状の細孔23を有するニトロセルロースメンブレン22等を用いて作製された従来のマクロアレイ20では、当該メンブレン状に配置された生体高分子含有スポット（ドット）24の平均直径が $200\mu\text{m}$ を下回ることはほとんど不可能であった。このため、メンブレンの単位面積当りのスポット数は、かかる生体高分子含有スポット24の大きさによって制限されていた（図4参照）。なお、図4は、模式図であるため、スポット24を実線で表しているが、実際には核酸を含むスポット24が視認し得ないものであることは当業者の理解するところである。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、マクロアレイに関する上記従来の問題を解決するものであり、その目的とするところは、生体高分子等の被検物質を含有するスポットの大きさ（直径）を小さくして従来のものよりも高密度にスポットを配置したマクロアレイを提供す

ることである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成し得る本発明のマクロアレイは、相互に独立した貫通孔を備えた多孔質メンブレンに被検物質を含むスポットを多数配置して成ることを特徴とするマクロアレイ（以下「高密度マクロアレイ」という。）である。

【0007】なお、本明細書において「マクロアレイ」とは、メンブレン上に被検物質含有スポットが多数（典型的にはマトリクス状に）配置された膜状体をいう。典型的には、遺伝子発現解析、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等の用途にポリヌクレオチド試料を含むスポットが多数配置されたものをいうが、かかる用途のものに限定されない。何らかの化学的反応や物理的反応によって目的とする物質（以下「標的物」という。）を同定、分析等するため、メンブレン上にかかる標的物を含み得る被検物質のスポットが多数（典型的にはマトリクス状に）配置された膜状体は、いずれも本明細書における「マクロアレイ」に包含される。

【0008】また、本明細書において「被検物質」とは、マクロアレイ上でハイブリダイゼーションその他の方法によって解析する対象となり得る物質の総称である。典型的にはDNA、RNA等のポリヌクレオチド、あるいは化学合成されたオリゴヌクレオチド、ペプチド等といった生体高分子（生体を構成する類の高分子電解質の総称）を指すが、これに限定されない。メンブレン上に吸着、固定され得るポリマーやモノマーは、いずれもここでいう被検物質に包含される。また、本明細書において「スポット」とは、生体高分子等の被検物質が吸着または固定されている、メンブレン上の視認可能な又は視認不可能な微小ポイントをいう。

【0009】本発明の高密度マクロアレイでは、被検物質含有スポットを形成する基材となる多孔質メンブレンにおける孔が相互に独立した貫通孔である。すなわち、網目構造のような孔と孔との連続するつながりがない。このため、被検物質を含む試料をメンブレン表面に滴下した場合、当該試料はその一部が上記貫通孔に滲入する一方、メンブレン表層における横方向への拡散は抑えられる。網目構造におけるような孔内部の間隙を伝ってメンブレン横方向へ試料が浸透することがないからである。

【0010】このため、本発明の高密度マクロアレイでは、従前のものよりもさらに微小なスポットがメンブレン上に形成され得る。本発明によれば、メンブレン単位面積当りに形成・配置するスポット数を従来より増大させ得、高密度に配置することができる。

【0011】本発明の高密度マクロアレイの好ましい一態様は、上記多孔質メンブレンの貫通孔の平均孔径が $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ であることを特徴とするマクロアレイである。かかる範囲における平均孔径の独立貫通孔

を有する多孔質メンブレンによると、被検物質を含む試料の一部が当該平均孔径の貫通孔に滲入し得るとともにメンブレン表面における横方向への拡散防止能が向上する。このため、いっそう径の小さいスポットを高密度に形成・配置することができる。

【0012】本発明の高密度マクロアレイの好ましい他の態様は、上記多孔質メンブレンの膜厚が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ のマクロアレイである。上記多孔質メンブレンの膜厚をこのように薄くすることにより、被検物質含有試料の上記貫通孔内部に浸透される量を低減させることができる。このため、より少ない量の被検物質含有試料でメンブレン上にスポットを高密度に形成・配置することができる。

【0013】また、本発明の高密度マクロアレイとして好ましい他の態様は、上記多孔質メンブレンを支持するための支持材が備えられているマクロアレイである。本態様のマクロアレイでは、上記多孔質メンブレンの剛性が支持材によって補強される。このため、被検物質スポットが配置された多孔質メンブレンが破損し難く、また、折れ曲がりやしわの発生が抑えられ、従前のマクロアレイよりも安易に取り扱うことができる（持運び容易性や実験操作性が良い）。このため、本態様のマクロアレイはハイブリダイゼーションやオートラジオグラフィ等の作業をより容易に効率よく行うことができる。

#### 【0014】

【発明の効果】本発明の高密度マクロアレイによれば、従来のマクロアレイよりも高密度に多数の被検物質（スポット）を配置することができる。このため、単位面積当り、より多くの被検物質を解析することができる。従って、本発明の高密度マクロアレイによれば、一度に大量の試料を処理することができる。本発明の高密度マクロアレイの利用により、遺伝子発現解析、遺伝子スクリーニング、イムノアッセイ等を効率的に行うことができる。

#### 【0015】

【発明の実施の形態】本発明の高密度マクロアレイは、好ましくは以下のように作製され、以下のように使用され得る。

【0016】本発明の高密度マクロアレイに使用する多孔質メンブレンは、孔内の空隙が連続的に繋がっておらず、相互に独立した貫通孔を有する多孔質膜である。このような多孔質膜としては、例えば、相互に独立した貫通孔（典型的には円筒状貫通孔）が無数に形成されているポリカーボネート、ポリエステル、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート等から成る高分子膜が好ましい。特に膜表面に対してほぼ垂直に（即ち膜の厚み方向に沿って）形成された直孔タイプの貫通孔を備えたメンブレンが本発明における多孔質メンブレンとして好適である。

【0017】このような貫通孔を備えた多孔質高分子膜

は、荷電粒子線、レーザー等を照射して高分子膜に細孔を形成し、さらにその細孔をアルカリ処理によるエッチングを施すことによって得ることができる。例えば、かかる荷電粒子線照射処理およびアルカリエッチングによって、直孔性の貫通孔が形成されたポリカーボネートメンブレン、ポリエステルメンブレン等は、本発明の多孔質メンブレンとして特に好適である。このような直孔性の貫通孔が形成されたポリカーボネートメンブレン、ポリエステルメンブレンは、ニュクリポアー（登録商標）メンブレンフィルター（米国ニュクリポアー社製品）として市販されており、本発明における上記多孔質メンブレンとして好適に使用され得る。なお、かかる荷電粒子線等の照射処理やアルカリエッチング処理等を伴う高分子膜への多孔形成プロセスは、有機化学工業上の公知技術であって本発明の根幹を成すものでもないため詳細な説明は省略する。

【0018】本発明の高密度マクロアレイを作製するための多孔質メンブレンとして好適なものは、平均孔径が概ね $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ のものである。さらに、全体にほぼ均一な孔径を有するものが特に好ましい。かかる平均孔径の貫通孔を備えたメンブレンでは、上述の理由により、微小な径のスポットをより高密度に形成することができる。平均孔径があまり小さすぎると滴下した試料がメンブレン表面上を拡散してしまうため好ましくなく、平均孔径があまり大きすぎると孔内への浸透量が増大して試料の浪費になるため好ましくない。

【0019】また、本発明の高密度マクロアレイを作製するための多孔質メンブレンとしては種々の膜厚のものが使用され得るが、典型的には $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の膜厚のものが上述の理由により好適である。膜厚があまり厚すぎると上記貫通孔に浸透する試料量が増大して試料の浪費を招く恐れがあるため好ましくなく、膜厚があまり薄すぎると強度（剛性）不足により取り扱いに支障をきたす恐れがあるため好ましくない。

【0020】また、本発明の高密度マクロアレイに使用され得る上記支持材は、上記多孔質メンブレンの剛性を高め、本発明の高密度マクロアレイの取り扱いを容易ならしめるためのものである。上記多孔質メンブレンの背面側（即ちスポット非形成面）に付着させ得る膜状のものが上記支持材として好ましい。かかる膜状支持材としては、セルロース、酢酸セルロース、再生セルロース、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリ塩化ビニル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート等が好適に利用され得る。多孔質のものが好ましい。また、これら有機高分子系膜状支持材の他、セルロース濾紙やガラスフィルター等も上記支持材として用い得る。

【0021】次に、上記多孔質メンブレンへの被検物質含有スポット形成について説明する。

【0022】使用する上記多孔質メンブレンの孔径によ

って変動し得るが、本発明によれば1スポットの直径を200 $\mu$ mまたはそれ以下、典型的には50 $\mu$ m~200 $\mu$ mにすることができる。50 $\mu$ m~100 $\mu$ mの微小スポット形成が好ましい。かかる微小スポットの形成は、現在市販されている種々の形式のアレイ作製用スポットター装置によって行うことができる。極微量の試料

(1 $\mu$ l以下)をスポッティングできる機構を有する限り、使用されるスポットター装置に制限はない。例えば、スライドガラス上にスポットの配列を形成するいわゆるマイクロアレイ作製用のスポットター装置も使用し得る。例えば、DNA等のポリヌクレオチドを含む試料が充填された複数の格子状に配置された極細キャピラリー又はピン(例えば24 $\times$ 36本)の各先端を多孔質メンブレンの表面に接近又は接触させつつ、当該極細キャピラリー又はピンを介して当該試料をメンブレン表面にスポットすることができる。

【0023】而して、本発明の高密度マクロアレイにおいても、従来のマクロアレイと同様、被検物質含有スポットにおいて被検物質がメンブレン上に、少なくとも一定期間固定されていることを要する。例えば、被検物質としての生体高分子がDNA、RNA等のポリヌクレオチドである場合、当該ポリヌクレオチド含有試料(典型的には2 $\times$ SSC等のバッファーに溶解したもの)をメンブレンに滴下した後、ベーキング処理(熱乾燥処理)、紫外線照射処理等を施すことによって、滴下した試料中のポリヌクレオチドをメンブレン上に固定することができる。例えば、ポリヌクレオチド含有溶液をメンブレンに滴下後、120KJ程度の紫外線をメンブレンに照射する。このことによって、滴下された試料中のポリヌクレオチドをメンブレン表面に効果的に固定することができる。

【0024】さらに、被検物質としての生体高分子のメンブレン上への吸着・固定を促進する資材を当該メンブレン表面に予めコーティングする手段を採用してもよい。例えば、アンモニウムイオン等を含有する塩基性接着剤や塗料のようなカチオン性ポリマーあるいはポリリシンpoly(Lys)で上記多孔質メンブレン表面をコーティングすることによって、イオン結合や疎水性結合による生体高分子の当該メンブレン上への吸着・固定を促進することができる。また、メンブレン表面をポジティブチャージすることによっても、生体高分子のような表面がマイナスチャージされている被検物質の吸着・固定を促進することができる。

【0025】上述のようにして作製された本発明の高密度マクロアレイは、従前の生体高分子吸着能を有するメンブレンと同様、種々の解析作業に使用することができる。例えば、被検物質がポリヌクレオチドである場合、遺伝子発現解析のための研究手段、例えば、ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィー或いは蛍光ラベルしたプローブを用いた場合はハイブリダイゼーシ

ョン後に蛍光スキャナーによる蛍光量の測定を、好適に行うことができる。あるいは、被検物質が抗原や抗体等を含む血清成分である場合は、従前のマイクロタイタープレートを用いた場合と同様のイムノアッセイを行うことができる。あるいは、被検物質がアレルゲンとなり得る各種化学物質である場合、種々のアレルギー検査方法等にも応用することができる。

【0026】

【実施例】以下の実施例により、本発明の高密度マクロアレイについてより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【0027】図1は、本実施例の高密度マクロアレイ1を模式的に示した斜視図である。図1に示すように、本実施例の高密度マクロアレイ1は、円筒状貫通孔を多数有する市販のポリカーボネート製メンブレン2(米国ニュクリポアー社製品:ニュクリポアー(登録商標)メンブレン)を使用した。図3に模式的に示すように、かかるメンブレン2は相互に独立した円筒状の貫通孔3(平均孔径:0.1 $\mu$ m)を多数有する膜厚が約10 $\mu$ mの親水性メンブレンである。また、図1に示すように、本実施例の高密度マクロアレイ1は、膜状の支持材6として上記ポリカーボネート製メンブレン2の背面側に多孔質のナイロン製メンブレン(膜厚:50~100 $\mu$ m)を付着させている。このことによって、上記ポリカーボネート製メンブレン2単独のマクロアレイよりもアレイ自体の剛性を向上することができる。

【0028】而して、予めポリリシン溶液に浸漬してポリリシンコーティングを施した本実施例のポリカーボネート製メンブレン2上に種々のDNA断片を被検物質として含むスポットを形成した。すなわち、複数の極細キャピラリーを備えたスポットター装置の当該極細キャピラリーの先端を接触させてDNA断片を含む溶液をメンブレン上に滴下した。その結果、図2に模式的に示すように、約300 $\mu$ mの間隔で直径約100 $\mu$ mのDNA断片を含む溶液からなるスポット4が相互に分離した状態でマトリクス状にメンブレン2上に配置された。すなわち、1cm四方の領域内に800~1000個のスポット4を高密度に形成することができた。なお、図2は、模式図であるため、スポット4を実線で表しているが、実際には核酸を含むスポット4が視認し得ないものであることは当業者の理解するところである。その後、紫外線を照射(120KJ)することによって、DNA断片をメンブレン2上に固定した。

【0029】次いで、DNA断片の一部(ここでの標的物)と相補的な一本鎖DNAを $^{32}$ Pでラベルして得たプローブを用いて通常のハイブリダイゼーション操作を行い、引き続いてオートラジオグラフィーを行った。その結果、標的物を含むスポットに特異的なシグナルを検出することができた。このことは、本実施例の高密度マクロアレイ1によって、従来のマクロアレイよりも高密度

に配置した多数の被検物質（スポット）から標的物を検出・解析し得ることを示すものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の高密度マクロアレイの一例を模式的に示す斜視図

【図 2】本発明の高密度マクロアレイの一使用例を模式的に示す平面図

【図 3】本発明の高密度マクロアレイにおける多孔質メンブレンの直孔構造を模式的に示す一部破断の斜視図

【図 4】従来のマクロアレイの一使用例を模式的に示す

平面図

【図 5】従来のマクロアレイにおける多孔質メンブレンの網目構造を模式的に示す断面図

【符号の説明】

1, 20 マクロアレイ

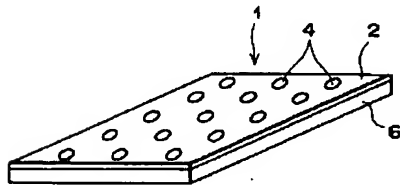
2, 20 メンブレン

3, 23 孔

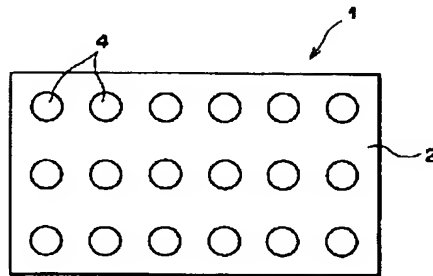
4, 24 スポット

6 支持材

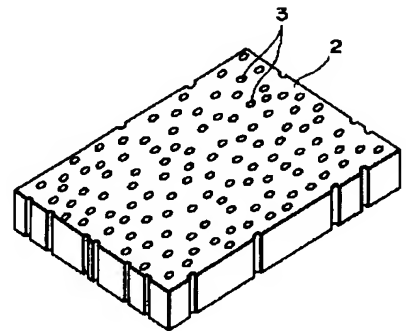
【図 1】



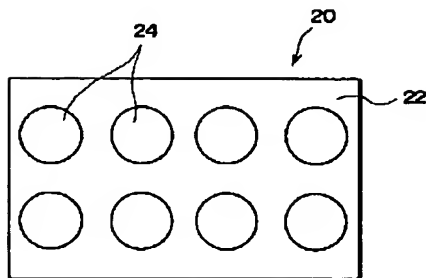
【図 2】



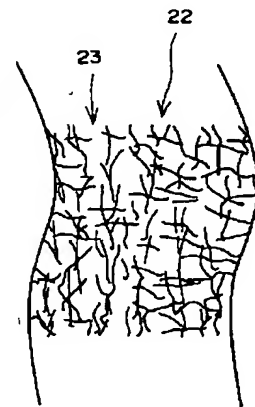
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/53

33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

テームコード（参考）

Z